

## Детоксикационные Свойства Серотонин-Модулируемого Антиконтрастиционного Белка в Отношении Токсинов Химической и Бактериальной Природы

С.К. Мовсум-заде<sup>2</sup>, А.А. Мехтиев<sup>2</sup>, Х.Ш. Мехтиев<sup>1</sup>, У.Г. Телфорд<sup>3</sup>, А.А. Гайсина<sup>2</sup>, Ш.Х. Зейналов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт медицинской профилактики им. В.Ахундова МЗ, Баку, Азербайджан

<sup>2</sup>Институт физиологии им. А.И.Караева НАНА, Баку, Азербайджан; E-mail: arifmekht@yahoo.com

<sup>3</sup>Национальный институт рака, Бетесда, США

**В работе изучена активность нового серотонин-модулируемого антиконтрастиционного белка (СМАБ), находящегося в прямой зависимости от уровня серотонина, как детоксикационного агента в отношении токсинов химической и бактериальной природы. Обнаружено, что введение СМАБ животным обеспечивает детоксикационную и антимуtagenную защиту клеток организма от повреждающего воздействия токсинов. Методом вестерн блоттинга продемонстрирована способность СМАБ стимулировать усиленный синтез белка теплового шока с мол. массой 70 кДа (БТШ70). Детоксикационную активность СМАБ авторы объясняют за счёт усиления синтеза БТШ70, а также за счёт его возможного влияния на процессы конденсации/деконденсации структуры хроматина.**

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время обнаружены эндогенные белки, обладающие выраженными детоксикационными свойствами. К таким белкам, в частности, относится белок теплового шока с мол. массой 70 кДа (БТШ70). Известно, что БТШ70 обладает широким спектром протекторных свойств, позволяющим клеткам противостоять воздействию аноксии (Spector et al., 1998), повышенной температуры (Sharp et al., 1999), изменений pH в кислую (Nishimura et al., 1989) и щелочную (Petronini et al., 1995) стороны, судорожной активности (Sharp et al., 1999). Наряду с этим, различными авторами обнаружено изменение активности серотонинэргической системы у разных видов животных в результате воздействия на организм тяжёлых металлов и полиароматических углеводородов (Köhler and Ekwert, 1997). В частности, продолжительная экспозиция рыб в воде, содержащей примеси меди (Handy, 2003) и ртути (Tsai et al., 1995), а также длительная экспозиция ракообразных в воде, содержащей примеси тяжёлых металлов и органических соединений (Fingerman et al., 1998) приводят к значительному снижению уровня серотонина в тканях животных. Вместе с тем, остаётся недостаточно ясным характер участия серотонинэргической системы в реагировании клеток организма на воздействие неблагоприятных факторов окружающей среды.

В Институте физиологии им. А.И.Караева НАН Азербайджана в коре головного мозга крыс был идентифицирован и из целого мозга крыс выделен новый серотонин-модулируемый

антиконтрастиционный белок (СМАБ), находящийся в прямой зависимости от уровня серотонина и обеспечивающий внутриклеточную передачу серотонинового сигнала (Мехтиев, 2000). В ранее проведенных исследованиях было обнаружено, что кратковременная экспозиция (5 сут) молоди осетров в воде, содержащей примеси нефти, не вызывает изменения уровня СМАБ в печени и не индуцирует мутации в эритроцитах, тогда как продолжительная экспозиция (15 сут) приводит к истощению ресурсов синтеза и снижению уровня СМАБ в печени с одновременным повышением уровня мутаций в эритроцитах (Мехтиев и др., 2010). Исходя из этих данных, возникло предположение о возможной детоксикационной активности СМАБ, и основной задачей настоящего исследования было изучение участия СМАБ в обеспечении механизмов протекции тканей организма от повреждающих эффектов токсинов химической и бактериальной природы.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение СМАБ осуществляли из головного мозга быка ранее описанным способом (Мехтиев, 2000), гомогенность очищенного белка оценивали методом электрофореза. Иммуноглобулины к СМАБ получали в результате 3-4-месячной иммунизации кроликов путём подкожных инъекций очищенного белка в количестве 300 мкг всегда в смеси с равным объёмом полного адьюванта Фрейнда.

В первой серии опыты были выполнены на

годовалой молодежи осетров (*Acipenser gueldenstaedti persicus*). Осетров разбили на 3 группы: 1) контроль (n=11) – животных содержали в контейнерах с пресной водой; 2) 1-ая опытная группа (n=12) – животных помещали на 3 сут в воду, в которую предварительно добавляли донные отложения из зоны Бакинской бухты в концентрации 0,8 мл/л, после чего их переводили в чистую воду на 7 сут; 3) 2-ая опытная группа (n=13) – животным предварительно внутримышечно вводили СМАБ в объёме 1 мл и концентрации 1,5 мг/мл и помещали на 3 сут в воду с примесями донных отложений (0,8 мл/л), после чего им вновь инъецировали СМАБ и переводили в чистую воду (7 сут). По завершении опыта из хвостовой вены забирали кровь, делали мазки на предметных стёклах и окрашивали по Романовскому-Гимзе. Уровень мутагенных изменений оценивали с помощью микроядерного теста по количеству микроядер, обнаруживаемых в цитоплазме 1000 эритроцитов в результате исследования окрашенных мазков крови под световым микроскопом (Schmid, 1975).

Анализ состава донных отложений, добавленных в воду в первой серии опытов, осуществляли методом атомно-абсорбционной спектроскопии.

Во второй серии опыты были выполнены на белых мышцах весом 17-25 г. Мышей разбили на 3 группы: 1) интактная группа (n=10) – животных содержали в стандартных клетках; 2) контрольная группа (n=10) – у животных вызывали перитонит; 3) опытная группа (n=12) – у животных вызывали перитонит и вводили СМАБ. Перитонит создавали в результате интраперитонеального введения патогенной формы кишечной палочки (*Escherichia coli*), полученной от больных с урогенитальной инфекцией и выращенной предварительно в агаре Endo, MacConkey, ChromID CPS и среде Levin при температуре 37°C. Для получения чистой культуры штаммы дополнительно пересеивали в питательную среду Kligler. Для индукции перитонита выбирали наиболее патогенные штаммы кишечной палочки, патогенность которых определяли путём измерения у них активности ДНК-азы, протеолитической и гемолитической активностей. Кроме того, дополнительным критерием для отбора штаммов служила их полирезистентность по отношению к широкому спектру антибиотиков, которую выявляли в культуральных средах Müller-Xinton и AQV. СМАБ вводили мышам внутримышечно каждый раз по 0,3 мг, 0,6 мг и 1 мг (концентрацию белка определяли по методу Бредфорд) в физиологическом

растворе трижды: в 11.00, 18.00 и 11.00 часов следующего дня. Выживаемость мышей в контрольной и опытной группах регистрировали на протяжении 4 сут.

Исследования непосредственного воздействия СМАБ на воспроизводство колоний кишечной палочки проводили путём добавления СМАБ в концентрации 1 мг/мл к расплавленному агару Endo при температуре 40°C, после застывания которого в среде высевали бактериальные штаммы и выдерживали в термостате при 37°C, после чего подсчитывали и сравнивали количество колоний в контрольной и экспериментальной чашках Петри.

Для изучения влияния СМАБ на индукцию синтеза БТШ70 были сформированы 2 группы животных: 1) контрольным животным (белые мыши весом 20 г) вводили инактивированный СМАБ (прогревание на водяной бане при 55°C в течение 35 мин) в количестве 1 мг; 2) животным опытной группы внутримышечно вводили СМАБ – 1 мг. Через 5 ч животных умерщвляли и извлекали образцы печени, из которых экстрагировали водорастворимые белки в экстрагирующем буфере, содержащем 0.05 М фосфатный буфер (pH 7.2), 0.3 М NaCl, 5 мМ ЭДТА и 0.1% тритон X-100. Эти белки фракционировали методом электрофореза в градиенте плотности полиакриламидного геля (4-12%). После завершения электрофореза осуществляли перенос белковых полос на нитроцеллюлозную мембрану с размером пор 0.2 мкм в течение 1 ч в аппарате для вестерн блоттинга под напряжением 80 вольт. После переноса белковых фракций нитроцеллюлозную мембрану инкубировали в блокирующем буфере при постоянном покачивании на рокере, затем её инкубировали с поликлональными антителами к БТШ70 в разведении 1:1000 в буфере для антител в течение ночи при 4°C при постоянном покачивании на рокере. Далее мембрану трижды отмывали и инкубировали с козьими противокроличьими иммуноглобулинами, конъюгированными с пероксидазой хрена (вторые антитела) в разведении 1:5000 в буфере для антител при комнатной температуре в течение 1 ч. Мембрану трижды отмывали и подвергали воздействию хемолуминисцентного раствора в течение 1 мин при постоянном покачивании на рокере, встряхивали и промокали салфеткой, оборачивали прозрачной плёнкой, накрывали фотографической плёнкой для автордиографии, помещали в кассету для автордиографии и экспонировали в течение 5 мин, после чего фотоплёнку проявляли, фиксировали и промывали водой.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ состава донных отложений из зоны Бакинской бухты с целью определения элементного состава и присутствия нефтепродуктов позволил выявить следующую картину: нефтепродукты – 38,87 мг/г сухого вещества; цинк – 1962 мкг/г; медь – 78,6 мкг/г; никель – 13,3 мкг/г; свинец – 388,7 мкг/г; марганец – 166,5 мкг/г; кадмий – 0,39 мкг/г; серебро – 17,1 мкг/г; кобальт – 6,8 мкг/г; железо – 13291 мкг/г.

В результате экспозиции молоди осетров в пресной воде, содержащей донные отложения, было обнаружено значительное увеличение уровня мутагенных изменений в эритроцитах животных по сравнению с контрольным уровнем ( $p < 0.001$ ; Рис. 1). В то же время у животных из 2-ой опытной группы, которым до помещения в воду с донными отложениями и при переводе в чистую воду дважды внутри-

мышечно вводили СМАБ, уровень мутагенных изменений оказался сниженным вдвое ( $p < 0.01$  относительно средних значений 1-ой опытной группы; Рис. 1). Таким образом, искусственное повышение активности серотонинэргической системы на внутриклеточном уровне в тканях путём внутримышечного введения СМАБ приводило к значительному снижению уровня мутаций, вызванных воздействием неблагоприятных условий окружающей среды на организм животных, и, таким образом, к нивелированию влияния неблагоприятных условий.

При создании перитонита мышам контрольной и опытной групп внутривентриально вводили приблизительно 800000-1000000 единиц суспензии кишечной палочки на животное. Применение указанной дозы приводило к гибели 70% животных из контрольной группы на 4-ый день после введения суспензии кишечной палочки (Рис. 2).

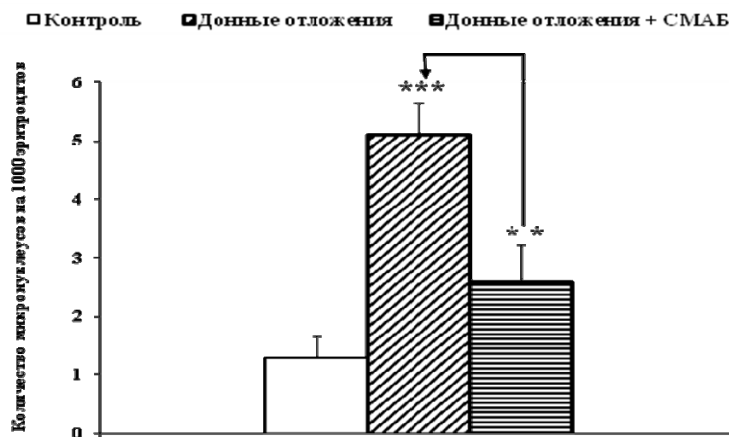


Рис. 1. Влияние СМАБ на уровень микроядер в эритроцитах рыб, содержащихся в загрязнённой донными отложениями воде. \*\* -  $p < 0.01$ ; \*\*\* -  $p < 0.001$ .

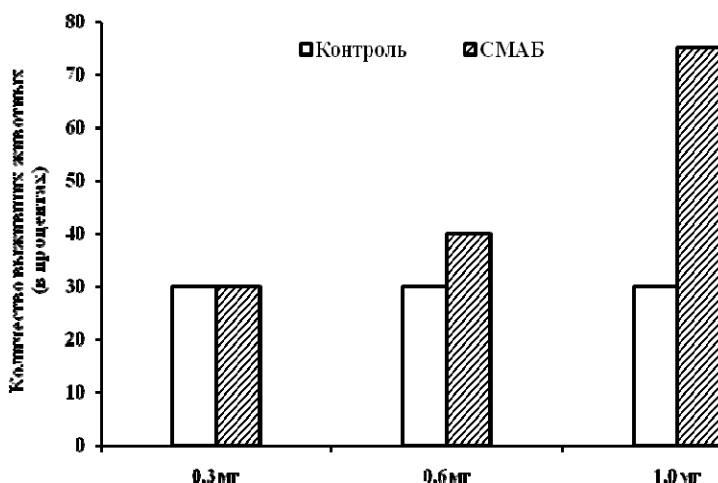
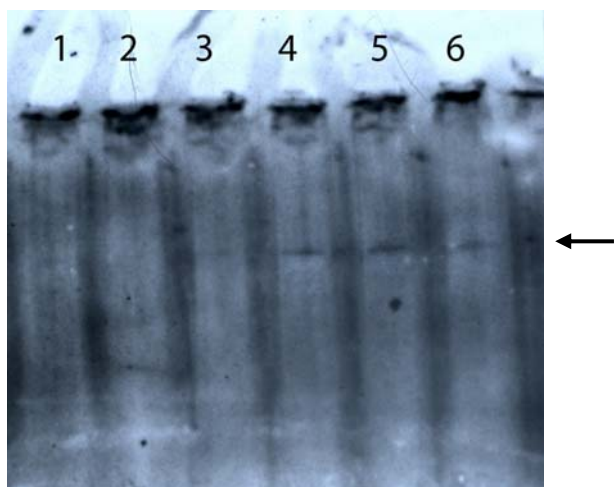


Рис. 2. Влияние внутримышечного введения СМАБ на выживаемость мышей, поражённых перитонитом. \* -  $p < 0.05$ .

Внутримышечное введение различных количеств СМАБ животным осуществляли дважды в первый день и один раз утром следующего дня сразу после внутрибрюшинного введения суспензии кишечной палочки. Используемые однократные дозы 0.3 и 0.6 мг СМАБ не оказывали влияния на количество выживших животных. Вместе с тем трёхкратное введение по 1 мг СМАБ приводило к 75%-ному выживанию животных на 4-ый день после введения суспензии кишечной палочки по сравнению с 30%-ным выживанием в контрольной группе животных ( $p < 0.05$ ; Рис. 2). Описанный положительный эффект инъекций СМАБ на выживание животных был воспроизведён несколько раз.

Для выявления возможного негативного влияния СМАБ на репродукцию кишечной палочки его добавляли непосредственно в культуральную среду незадолго перед посевом штаммов. Однако в результате проведенного исследования не было выявлено изменений в росте колоний кишечной палочки в культуральной среде под влиянием СМАБ относительно контрольного посева штаммов в среду, лишённую СМАБ.



**Рис. 3.** Влияние внутримышечного введения СМАБ на уровень БТШ70 в печени мышей. Полосы 1-3 – фракции водорастворимых белков печени мышей, инъецированных инактивированным СМАБ; полосы 4-6 – фракции водорастворимых белков печени мышей, инъецированных нативным СМАБ. Стрелкой указана локализация БТШ70 на фореграмме.

Методом вестерн блоттинга с применением поликлональных антител к БТШ70 было выявлено, что внутримышечное введение СМАБ мышам по прошествии 5 ч приводило к резкому увеличению уровня БТШ70 в печени животных опытной группы, тогда как введение инактивированного нагреванием СМАБ в контрольной группе животных не вызывало изменения в

уровне БТШ70 (Рис. 3). Обработка моноклональными антителами к тубулину нитроцеллюлозной мембраны после переноса на неё водорастворимых белков печени мыши и вымывание с мембраны антител к БТШ70 с помощью стриппингового буфера указывает на равномерное распределение тубулина между различными белковыми полосками, что свидетельствует о равномерной загрузке карманов с белковыми пробами контрольных и опытных животных в полиакриламидном геле во время проведения электрофореза и исключает возможность интерпретации увеличенного количества БТШ70 в связи с неодинаковым количеством нанесённых белковых проб. Таким образом, полученные методом вестерн блоттинга данные указывают на индукцию усиленной синтеза БТШ70 под влиянием введённого извне СМАБ.

Исходя из полученных в данном исследовании данных, можно прийти к заключению о том, что выявленная детоксикационная активность СМАБ в отношении токсинов химической и бактериальной природы обусловлена стимулирующим эффектом СМАБ на синтез БТШ70, который, являясь белком-шапероном, обеспечивает защиту клеток организма от повреждающего воздействия неблагоприятных факторов, в том числе токсинов. Эти результаты согласуются с косвенными данными, полученными другими исследователями, продемонстрировавшими наличие регуляторного влияния серотонина на синтез БТШ70. В частности, в экспериментах на самках тилипии (*Oreochromis mossambicus*), выполненных в преднерестовый период, исследовали влияние серотонина на предпочтение температур (Tsai et al., 2002). Рыб содержали в термоградиенте, который представлял собой аппарат, состоявший из 8 камер, в которых поддерживали температуру от 14 до 44°C. Было обнаружено, что микроинъекции серотонина (3 мкл в концентрации  $10^{-6}$  М) в гипоталамус вызывали достоверное увеличение избираемой рыбами температуры.

Обнаруженная детоксикационная и антимутagenная активности СМАБ в отношении примененных токсинов могут быть также обусловлены способностью СМАБ вызывать конформационные перестройки в структуре хроматина, переводя его в конденсированное и более защищённое от неблагоприятных воздействий состояние. Детоксикационная активность СМАБ в отношении бактериальных токсинов в настоящее время может иметь важное значение в клинической практике, в связи с тем, что вследствие высокого уровня мутирования бактериальных штаммов зачастую даже антибио-

тики нового поколения оказываются неэффективными в борьбе против возбудителей инфекционных заболеваний человека бактериальной природы.

**Благодарность.** Исследования выполнены при финансовой поддержке фонда “Biology and Technology Engagement Program”, США.

## ЛИТЕРАТУРА

- Мехтиев А.А.** (2000) Обнаружение в головном мозге крыс белка, обладающего антиконсолидационными свойствами. *Бюллетень экспер. биол. мед.*, **129(8)**: 147-150.
- Мехтиев А.А., Палатников Г.М., Мовсум-заде С.К., Касимов Р.Ю.** (2010) Возрастание уровня мутаций в тканях бычков и молоди осетров в условиях блокады антителами серотонин-модулируемого антиконсолидационного белка. *Журнал эволюц. биохим. физиол.*, **46(5)**: 375-379.
- Schmid W.** (1995) The micronucleus test. *Mutat. Res.*, **31(1)**: 9-15.
- Fingerman M., Jackson N.C., Nagabhushanam R.** Hormonally-regulated functions in crustaceans as biomarkers of environmental pollution. *Comparative Biochem. Physiol. Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, **120(3)**: 343-350.
- Handy R.D.** (2003) Chronic effects of copper exposure versus endocrine toxicity: two sides of the same toxicological process? *Compar. Biochem. Physiol. – Part A: Molec. Integr. Physiology*, **135(1)**: 25-38.
- Köhler H.R., Ekwert H.** (1997) The induction of stress proteins (hsp) in *Oniscus asellus* (Isopoda) as a molecular marker of multiple heavy metal exposure. II. Joint toxicity and transfer to field situations. *Ecotoxicology*, **6**: 263-274.
- Nishimura R.N., Dwyer B.E., Cole R., Vellis J., Picard K.** (1989) Induction of the major inducible 68-kDa heat-shock protein after rapid changes of extracellular pH in cultured rat astrocytes. *Exp. Cell Res.*, **180(1)**: 276-280.
- Petronini P.G., Alfieri R., Campiani C., Borghetti A.F.** (1995) Effect of alkaline shift on induction of the heat shock response in human fibroblasts. *J. Cell Physiol.*, **162(3)**: 322-329.
- Sanders B.M.** (1998) Stress proteins: Potential as multitiered biomarkers. *Environmental Biomarkers* (eds. L.Shugart, J.McCarthy). Chelsea, MI, Lewis Publishers: 165-191.
- Sharp F.R., Massa S.M., Swanson R.A.** (1999) Heat-shock protein protection. *Trends Neurosci.*, **22(3)**: 97-99.
- Spector M.P., Aliabadi Z., Gonzalez T., Foster J.W.** (1998) Global control in *Salmonella typhimurium*: Two-dimensional electrophoretic analysis of starvation-, anaerobiosis-, and heat-shock-induction proteins. *J. Bacteriol.*, **180(2)**: 420-424.
- Tsai Ch.L., Jang T.H., Wang L.H.** (1995) Effects of mercury on serotonin concentration in the brain of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Neurosci. Lett.*, **194(3)**: 208-211.
- Tsai Ch.L., Wang L.H., Tsai Ch.Ch.** (2002) Role of serotonin,  $\gamma$ -aminobutyric acid, and glutamate in the behavioral thermoregulation of female tilapia during the pre-spawning phase. *J. Exp. Zool.*, **293(5)**: 443-449.

## Kimyəvi Və Bakterioloji Mənşəli Toksinlərə Qarşı Serotonin-Modullu Antikonsolidasiya Zülalının Detoksikasiya Xüsusiyyətləri

S.K.Mövsum-zadə<sup>2</sup>, A.Ə.Mehdiyev<sup>2</sup>, Kh.Ş.Mehdiyev<sup>1</sup>, U.Q.Telford<sup>3</sup>, A.A.Qaisina<sup>2</sup>, Ş.Kh.Zeynalov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> V.Axundov adına Tibbi Profilaktika İnstitutu

<sup>2</sup> AMEA A.İ.Garayev adına Fiziologiya İnstitutu

<sup>3</sup> ABŞ Milli Xərçəng İnstitutu

Bu məqalədə kimyəvi və bakterioloji mənşəli toksinlərə qarşı detoksik agent kimi serotonin ilə düz mütənasib əlaqədə olan yeni serotonin-modullu antikonsolidasiya zülalının (SMAZ) fəallığı öyrənilib. Aşkar olunmuşdur ki, heyvanlara SMAZ-ın daxil edilməsi orqanizmin hüceyrələrini toksinlərin dağıdıcı təsirindən müdafiəsini təmin edir. Vestern blotting üsulu ilə 70 kDa molekulyar kütləsi olan istilik şoku zülalının (İŞZ70) artırılmış sintezinin SMAZ tərəfindən stimullaşdırılması göstərilib. Müəlliflər SMAZ-ın detoksik aktivliyini İŞZ70 sintezinin guclənməsi, həmçinin onun xromatin strukturunun kondensasiya/dekondensasiya proseslərinə gümanedici təsiri ilə izah edirlər.

**Detoxic Properties Of Serotonin-Modulating Anticonsolidation Protein To Toxins Of Chemical And Bacterial Origin**

**S.K.Movsum-Zadeh<sup>2</sup>, A.A.Mekhtiev<sup>2</sup>, Kh.Sh.Mehdiyev<sup>1</sup>, W.G.Telford<sup>3</sup>, A.A.Gaisina<sup>2</sup>, Sh.Kh.Zeynalov<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup> Institute of Medical Prophylactics named after of V.Akhundon*

*<sup>2</sup> Institute of Physiology named after A.I.Garayev*

*<sup>3</sup> U.S. National Cancer Institute*

The activity of a novel serotonin-modulating anticonsolidation protein (SMAP), being in linear relationship with serotonin, as a detoxic agent against toxins of chemical and bacterial origin was studied. It was found that SMAP administration to animals provides detoxic and antimutagenic protection of organism's cells from damaging effects of toxins. With application of western blotting technique ability of SMAP to induce upregulation of heat shock protein with molecular mass of 70 kDa (HSP70) is shown. Authors explain detoxic activity of SMAP due to upregulation of HSP70 as well as due to its possible effect on condensation/decondensation processes of the chromatin structure.